

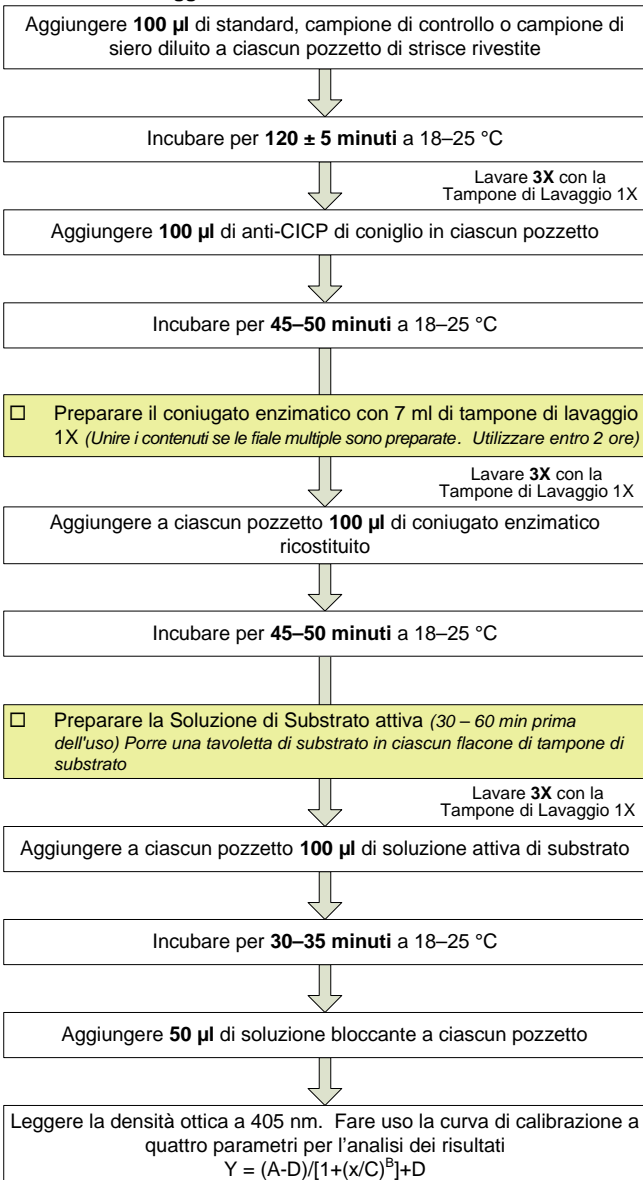
Saggio immunoenzimatico per la misurazione quantitativa di propeptide C-terminale del collagene di tipo I (CICP) nel siero

### MicroVue™ CICP EIA Sommario

#### Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire con acqua deionizzata il tampone di lavaggio 10X in un rapporto di 1:10
- Diluire i campioni di siero in un rapporto di 1:12 con tampone del saggio (ad esempio 25 µl di siero + 275 µl tampone del saggio)

#### Procedura del Saggio



### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il collagene, la molecola a tripla elica che forma la struttura fibrosa di tutti i tessuti connettivi, viene sintetizzato come procollagene, una molecola precursore di dimensioni maggiori. Il procollagene contiene collagene maturo con peptidi di estensione ad entrambe le estremità amino-

e carbossi-terminale. Tali peptidi di estensione, o propeptidi, vengono scissi dalla molecola di collagene tramite proteasi specifica prima dell'incorporamento del collagene in una fibrilla di collagene. Il rilascio di tali peptidi nella circolazione fornisce una rappresentazione stechiometrica della produzione di collagene.

Il MicroVue CICP EIA Kit fornisce un metodo quantitativo per determinare i livelli di CICP (terminale C del collagene di tipo I) nel siero. I livelli di CICP sono indicativi della produzione di collagene *in vivo*. In qualità di componente organico principale dell'osso, i livelli del collagene di tipo I sono stati collegati alla crescita e alla formazione dell'osso. Elevati livelli di CICP sono stati riscontrati in patologie associate ad alti livelli di ricambio osseo, compreso il morbo di Paget delle ossa, ipertiroidismo, iperparatiroidismo principale e osteodistrofia renale. In alcuni casi si sono documentati elevati livelli di CICP nella menopausa precoce. Bassi livelli di CICP sono stati rilevati nei bambini che presentano una carenza dell'ormone della crescita.

### PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

MicroVue CICP assay è un saggio immunoenzimatico di tipo "sandwich" in formato di piastra per la microtitolazione che utilizza un anticorpo monoclonale anti-CICP rivestito sulla piastra, un antisiero anti-CICP di coniglio, un coniugato di fosfatasi alcalina anti-coniglio di capra e un substrato pNPP per la quantificazione del CICP nel siero umano.

### REAGENTI E MATERIALI FORNITI

#### 96 saggi per il propeptide C-terminale del collagene di tipo I nel siero

MicroVue CICP EIA kit contiene i seguenti materiali:

- A Standard CICP:** Codici 4138 - 4143 0,75 ml ciascuno
- B Standards A-F, pronti all'uso, per le concentrazioni vedere**
- C Certificato di analisi**
- D** CICP purificato da cellule di fibroblasti umani in una soluzione
- E** tamponata contenente detergente nonionico, stabilizzatore e
- F** azide di sodio (0,05 %) come conservante
- L Campione di controllo** Codici 4144 0,75 ml  
CICP purificato da cellule di fibroblasti umani in una soluzione tamponata contenente detergente nonionico, stabilizzatore e azide di sodio (0,05 %) come conservante
- H Campione di controllo** Codici 4145 0,75 ml  
CICP purificato da cellule di fibroblasti umani in una soluzione tamponata contenente detergente nonionico, stabilizzatore e azide di sodio (0,05 %) come conservante
- 1 Strisce rivestite** Codice 4672 12 ciascuno  
Anticorpo monoclonale anti-CICP murino purificato assorbito in Stripwell
- 2 Soluzione bloccante** Codice 4702 15 ml  
0,5 N NaOH



## Soluzione di substrato attiva

Preparare la soluzione di substrato attiva entro 1 ora dall'utilizzo. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 18–25 °C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30–60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente. Dopo l'uso, gettare la rimanente soluzione di substrato attiva.

## CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2–8 °C.

Conservare i reagenti inutilizzati a 2–8 °C.

Conservare il tampone di lavaggio 1X (diluito 10X) a 18–28 °C.

## PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare i campioni di siero adottando una tecnica di venopuntura standard, senza usare anti-coagulanti e in modo da evitare l'emolisi. Lasciare che il sangue coaguli e separare il siero tramite centrifugazione. Il siero refrigerato (2–8 °C) può essere conservato per un periodo inferiore a 5 giorni, mentre congelato a  $\leq -20$  °C può essere conservato per periodi più lunghi. Non sottoporre i campioni a più di 3 cicli di congelamento/decongelamento.

## PROCEDURA DEL SAGGIO

### Prima di iniziare il saggio, leggere completamente l'inserto fornito con il prodotto.

Prima di procedere, fare riferimento a *PREPARAZIONE DEL REAGENTE*.

### Determinare la quantità necessaria di ciascun reagente per il numero di strisce da usare.

# di strisce	4	6	8	12
# di campioni (sottoposti a test in duplicato)	8	16	24	40
Coniugato enzimatico (fiala)	1	1	2*	2*
Tampone del substrato (flacone)	1	1	2*	2*
Tampone di lavaggio 1X (ml)	100	150	200	300

\* Quando viene usato più di un flacone o di una fiala, unire i contenuti e miscelarli prima dell'uso.

### Diluizione/incubazione dei campioni

- Diluire i campioni di siero in un rapporto di 1:12 con tampone del saggio (ad esempio 25  $\mu$ l di siero + 275  $\mu$ l tampone del saggio).
- Prima dell'apertura, lasciar equilibrare a 18–25 °C la busta protettiva contenente le strisce rivestite. Rimuovere il telaio Stripwell dalla busta protettiva e il numero necessario di strisce rivestite (fare riferimento alla tabella). Verificare che la busta protettiva con le strisce inutilizzate venga sigillata completamente e che contenga l'essiccante.
- Prima dell'uso, porre il numero desiderato di strisce rivestite nel telaio Stripwell. Etichettare le strisce per evitare di fare confusione nel caso di una rimozione accidentale dal telaio Stripwell.
- Aggiungere 100  $\mu$ l di standard, campione di controllo o campione di siero diluito a ciascun pozzetto di strisce rivestite. È necessario completare questa fase entro 30 minuti.

- Incubare per  $120 \pm 5$  minuti a 18–25 °C.

### Fase di lavaggio (1)

- Preparare la quantità necessaria di tampone di lavaggio 1X (fare riferimento alla tabella) diluendo con acqua deionizzata il tampone di lavaggio concentrato 10X in un rapporto di 1:10. Conservare a 18–28 °C. Utilizzare il tampone di lavaggio 1X entro 21 giorni dalla preparazione.
- Capovolgere/svuotare manualmente le strisce. Aggiungere a ciascun pozzetto almeno 300  $\mu$ l di tampone di lavaggio 1X e capovolgere/ svuotare le strisce. Ripetere la procedura per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. Asciugare accuratamente le strisce su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.

### Incubazione dell'anticorpo

- Aggiungere 100  $\mu$ l di anti-CICP di coniglio in ciascun pozzetto.
- Incubare per 45–50 minuti a 18–25 °C.
- Durante l'incubazione preparare il coniugato enzimatico. Ricostituire ciascuna fiala necessaria di coniugato enzimatico (fare riferimento alla tabella) con 7 ml di tampone di lavaggio 1X. Miscelare completamente. Utilizzare entro 2 ore.

### Fase di lavaggio (2)

- Capovolgere/svuotare manualmente le strisce. Aggiungere a ciascun pozzetto almeno 300  $\mu$ l di tampone di lavaggio 1X e capovolgere/ svuotare le strisce. Ripetere la procedura per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. Asciugare accuratamente le strisce su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.

### Incubazione del coniugato enzimatico

- Aggiungere a ciascun pozzetto 100  $\mu$ l di coniugato enzimatico ricostituito.
- Incubare per 45–50 minuti a 18–25 °C.
- Durante l'incubazione preparare la soluzione di substrato attiva. Porre una tavoletta di substrato in ciascun flacone necessario di tampone di substrato a 18–25 °C (fare riferimento alla tabella). Lasciar trascorrere 30–60 minuti per consentire alle tavolette di dissolversi. Agitare accuratamente i flaconi al fine di miscelarli completamente. Utilizzare entro 1 ora.

### Fase di lavaggio (3)

- Capovolgere/svuotare manualmente le strisce. Aggiungere a ciascun pozzetto almeno 300  $\mu$ l di tampone di lavaggio 1X e capovolgere/ svuotare le strisce. Ripetere la procedura per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. Asciugare accuratamente le strisce su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.

### Incubazione del substrato

- Aggiungere a ciascun pozzetto 100  $\mu$ l di soluzione attiva di substrato.
- Incubare per 30–35 minuti a 18–25 °C. Se non è possibile mantenere la temperatura ambiente fra i 18–25 °C e un'assorbanza di  $> 2,0$  non è compatibile con il lettore per piastra, monitorare lo sviluppo del substrato nei pozzetti standard F, bloccare la reazione quando la densità ottica raggiunge 1,2–1,5 quindi leggere le strisce.

## Arresto/Lettura

18. Aggiungere 50 µl di soluzione bloccante a ciascun pozzetto per arrestare la reazione.
19. Leggere la densità ottica a 405 nm. Garantire che nei pozzetti non sia presente alcuna bolla grande e che le estremità inferiori delle strisce siano pulite. Leggere le strisce entro 15 minuti dall'aggiunta della soluzione bloccante.
20. Usare il software di quantizzazione con equazione di adattamento della curva di calibrazione a quattro parametri (vedere di seguito) per l'analisi dei risultati del saggio MicroVue CICP.

$$\text{Equazione: } y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$$

21. Determinare la concentrazione dei campioni e dei campioni di controllo dalla curva standard.  
Diluire i campioni maggiori di 80 ng/ml nel tampone del saggio ed effettuare di nuovo il test. È necessario che i valori del campione di controllo si trovino all'interno della gamma specifica nel certificato di analisi fornito in dotazione con il kit.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Il certificato di analisi compreso in questo kit è specifico per il lotto e deve essere usato per verificare che i risultati ottenuti dal laboratorio siano simili a quelli ottenuti da Quidel Corporation. Vengono forniti valori della densità ottica che sono da usare esclusivamente come direttiva. È possibile che i risultati ottenuti dal laboratorio differiscano.

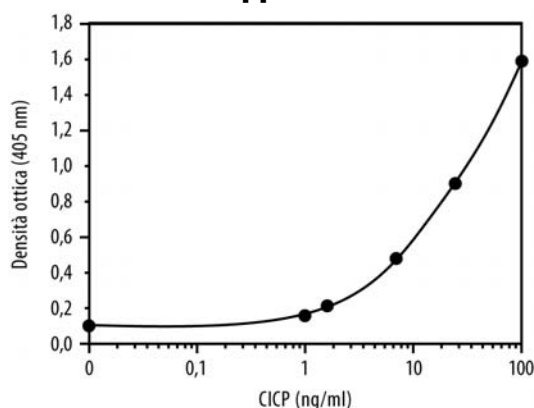
Vengono forniti i valori di gamma per il controllo di qualità. I valori di controllo sono destinati a verificare la validità della curva e i risultati del campione. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca i propri parametri per la definizione dei limiti di accettazione del saggio. Se i valori di controllo NON sono all'interno dei limiti di accettazione del laboratorio, i risultati del saggio devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

Se la densità ottica di MicroVue CICP Standard F è inferiore a 0,8, i risultati devono essere considerati discutibili e si dovranno ripetere i campioni.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dei campioni devono essere corretti in base alla diluizione eseguita. Se il campione è stato diluito in un rapporto 1:12, moltiplicare il valore ng/ml per 12 per il risultato finale di CICP di siero in ng/ml.

### Curva standard rappresentativa



## VALORI DI ESEMPIO

Nel test condotto su 279 adulti di età superiore ai 25 anni, i valori ottenuti tramite il kit MicroVue CICP erano compresi tra 69 e 163 ng/ml. Nel test condotto su 370 bambini di età compresa tra 4 e 18 anni, i valori CICP ottenuti erano compresi tra 110 e 966 ng/ml, con una media di 326 CICP ng/ml.

I valori possono essere influenzati da fattori quali crescita, bassa produzione di estrogeni, minore assunzione di calcio o scarsa attività fisica. La mancanza di estrogeni in donne in postmenopausa può causare un elevato ricambio osseo, quindi produzione di collagene. È necessario che ciascun laboratorio stabilisca il proprio valore di riferimento.

## PRESTAZIONI DEL TEST

### Specificità degli anticorpi

Gli anticorpi anti-CICP sono stati ottenuti da un CICP derivato da cellule di fibroblasti umani in coltura. Gli anticorpi dimostrano una reattività crociata del 100 % con il CICP nel siero umano.

### Limiti del rilevamento

Il limite di rilevamento analitico minimo di MicroVue CICP Assay è di 0,2 ng/ml, determinato dal limite superiore di 3 DS in uno studio standard zero.

### Precisione

La precisione all'interno di una stessa corsa e fra le corse è stata determinata valutando tre campioni di siero. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

CICP (ng/ml)	All'interno di una stessa corsa <sup>1</sup> C.V.(%)	Fra le corse <sup>2</sup> C.V.(%)
80,8	6,8	7,0
98,1	5,5	7,2
296,7	6,6	5,0

<sup>1</sup> n = 20 ripetizioni    <sup>2</sup> n = 3 in 3 corse

### Recupero – Linearità

La linearità è stata determinata diluendo in modo seriale i campioni e confrontando i valori osservati con i risultati attesi. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Fattore di diluizione	Osservato (ng/ml)	Atteso (ng/ml)	Recupero (%)
1	1:12	6,90	-	-
	1:24	3,50	3,45	101
	1:48	1,74	1,72	101
2	1:12	13,26	-	-
	1:24	6,56	6,63	99
	1:48	3,49	3,32	105
3	1:12	20,88	-	-
	1:24	10,43	10,44	100
	1:48	5,57	5,22	107

## Recupero – Recupero dei picchi

Il recupero dei picchi è stato determinato aggiungendo quantità note di CACP purificato ai campioni di siero con livelli diversi di CACP endogeno. I risultati tipici vengono forniti di seguito.

Campione	Endogeno (ng/ml)	Aggiunto (ng/ml)	Osservato (ng/ml)	Recupero (%)
1	9,09	13,24	22,28	100
		31,77	45,96	102
2	10,34	13,10	13,00	97
		32,71	43,05	96
3	12,43	13,24	22,28	100
		31,77	41,55	102

## ASSISTENZA

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore locale. Le ulteriori informazioni circa Quidel, i nostri prodotti ed i nostri distributori possono essere trovate sul nostro Web site a [www.quidel.com](http://www.quidel.com).

## BIBLIOGRAFIA

- Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987;36 (suppl no. 2S):001.
- Melkko J, Niemi S, Risteli J. Radioimmunoassay of the carboxy terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin. Chem.* 1990;36:1328-1332.
- Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone: Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone. Miner. Res.* 1987;2:427-436.
- Saggese G, Bertelloni S, Baroncelli GI, Di Nero G. Serum levels of carboxy-terminal propeptide of type I procollagen in healthy children from first year of life to adulthood and in metabolic bone diseases. *Eur. J. Pediatr.* 1992;151:764-768.
- Simon LS, Krane SM, Wortman PD, Krane IM, Kovitz KL. Serum levels of type I and III procollagen fragments in Paget's disease of bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984;58:110-120.
- Trivedi P, Risteli J, Risteli L, Hindmarsh PC, Brook CG, Mowat AP. Serum concentrations of type I and III procollagen propeptides as biochemical markers of growth velocity in healthy infants and children and in children with growth disorders. *Pediatr. Res.* 1991;30:276-280.
- Winterbottom N, Vernon S, Freeman K, Daniloff GY, Garnero P, Seyedin S. A serum immunoassay for the C-terminal propeptide of type I collagen. *J. Bone. Miner. Res.* 1993;8:5341. (abst)

## GLOSSARIO



Consulti le istruzioni per uso sul CDROM

REF 8003 – **MICROVUE** CACP EIA Kit  
Bone Health

 **QUIDEL**<sup>®</sup>  
CORPORATION  
SPECIALTY PRODUCTS  
RESEARCH TO RAPIDS<sup>®</sup>

Quidel Corporation | 10165 McKellar Court  
San Diego, CA 92121 USA | [www.quidel.com](http://www.quidel.com)



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Germany